

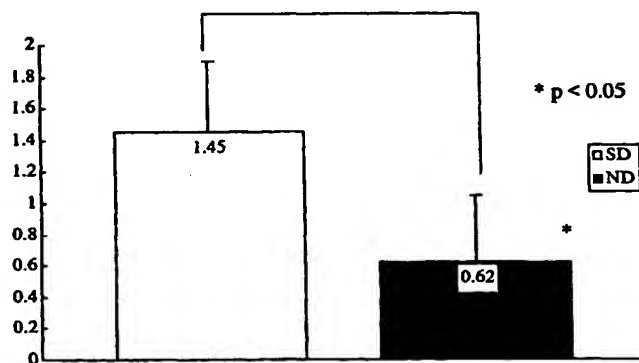
(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004年4月1日 (01.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/026342 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 48/00, 45/00, 31/711, A61P 9/00, 43/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2002/013805
- (22) 国際出願日: 2002年12月27日 (27.12.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2002-275884 2002年9月20日 (20.09.2002) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): アンジェス エムジー株式会社 (ANGES MG, INC.) [JP/JP]; 〒560-0082 大阪府 豊中市 新千里東町1丁目四番二号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (73) 発明者/出願人(米国についてのみ): 澤 芳樹 (SAWA, Yoshiki) [JP/JP]; 〒662-0099 兵庫県 西宮市 剣谷町8-3 Hyogo (JP). 新谷 卓司 (SHIN-TANI, Takuji) [JP/JP]; 〒565-0836 大阪府 吹田市 佐井寺2-29-5-502 Osaka (JP). 松田 暉 (MAT-SUDA, Hikaru) [JP/JP]; 〒659-0092 兵庫県 芦屋市 大原町20-5 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県 土浦市 卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国(国内): CA, JP, US.
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: AGENT CONTAINING NF $\kappa$ B DECOY FOR PROTECTING GRAFT AGAINST NEOINTIMAL THICKENING(54) 発明の名称: NF $\kappa$ Bデコイを含有する移植片新生内膜肥厚に対する保護剤

A \*p &lt; 0.05 vs. SD群

A... \*p &lt; 0.05 VS. SD GROUP

(57) Abstract: It is intended to provide a method of inhibiting neointimal thickening in a graft by using a decoy against NF $\kappa$ B and thus regulating (inhibiting) the transcription activated by NF $\kappa$ B. Also, an agent containing a decoy of NF $\kappa$ B which protects a vascular graft against intimal thickening.

(57) 要約: 本発明において、NF $\kappa$ Bに対するデコイを使用することにより、NF $\kappa$ Bにより活性化される転写を調節(抑制)し、移植片における新生内膜肥厚を抑制する方法を提供する。また、本発明は、NF $\kappa$ Bのデコイを含有する血管移植片の内膜肥厚に対する保護剤に関する。

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/026342 A1

- 1 -

## 明細書

NF $\kappa$ B デコイを含有する移植片新生内膜肥厚に対する保護剤技術分野

本発明は、血管または血管移植片の一部における転写因子 NF $\kappa$ B により活性化される転写を調節する方法に関する。特に、静脈移植片における NF $\kappa$ B により活性化される転写を NF $\kappa$ B に対するデコイを圧力介在(pressure-mediated)法により血管または血管移植片に導入することにより、移植片における新生内膜肥厚を抑制する方法に関する。また、本発明は、NF $\kappa$ B のデコイを含有する血管移植片の内膜肥厚に対する保護剤に関する。

背景技術

従来、虚血性疾患の治療法として冠状動脈の再建、膝下の膝窩動脈及び脛骨動脈の再建が行われている。これらの再建においては、主に自家内胸動脈や大伏在静脈が利用されることが多い。しかしながら、血管形成術、動脈バイパス術、器官の移植の後に、血管平滑筋細胞の増殖などにより血管が肥厚し、血管の閉塞がしばしば起こることが知られている。特に、冠動脈バイパス移植(coronary artery bypass grafting; CABG)の移植片として用いられる伏在静脈移植片(saphenous vein graft; SVG)は、内胸動脈等の動脈移植片を用いた場合と比べると長期開存率が劣り、現在では、動脈導管が利用されることが多くなっていることが報告されている(Hamby R.I. et al., Circulation 60: 901-9 (1979); Virmani T. et al., Cardiovasc. Clin. 18: 41-59 (1988); Acinapura A.J. et al., Eur. J. Cardiothorac. Sur. 3(4): 321-5 (1989); Loop F.D. et al., N. Engl. J. Med. 314: 1-6 (1986); Lytle B.W. et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 89: 248-58 (1985); Grondin C.M. et al., Circulation 78 (Suppl I): I24-I29 (

1989))。このような静脈移植片病(vein graft disease; VGD)が予防されれば、その優れた応用性のため静脈移植の役割は高まると考えられる。

VGD においては、動脈循環に静脈移植片を適用することにより顕著な新脈管内膜肥厚による静脈移植片の狭窄が観察される。動脈循環における静脈移植片の組織学的変化は Cox らにより調べられている。彼らは、マクロファージ及び好中球の浸潤を伴う線維内膜肥厚が 1 年以内に起こること、及び 1 年以上後にはアテローム性動脈硬化が主な病変を占めることを示した(Cox J.L. et al., Prog. Cardiovasc. Dis. 34: 45-68 (1991))。そして、Angelini らにより、中膜(medial)及び脈管内膜の肥厚に形態学的に 3 つの工程が寄与していることが報告されている。第一の工程は、移植から一週間後くらいに起こる、中膜における急激な平滑筋細胞増殖である。次の段階は、移植後 1~4 週間の間に起こる、中膜及び新脈管内膜の両方における平滑筋細胞の移動(migration)、肥厚、及び細胞外マトリックスの合成である。最後に、移植から 4 週間後に、よりゆっくりとした新脈管内膜における平滑筋細胞増殖という後期の段階に到る(Angelini G.D. et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 103: 1093-103 (1992))。

このような内膜肥厚病変の発生および進展の機序は完全に明らかにされているわけではないが、血管内皮への物理的傷害が引き金となり、血管平滑筋細胞の異常増殖が誘発され则认为られている(Nature 362: 801 (1993))。動脈性硬化性内膜肥厚や再狭窄は、血管の内皮傷害が最大の原因であると考えられている。特に静脈移植片の場合には、動脈循環への適用による張力及び剪断力の変化、並びに手術による血管壁の内皮が喪失し、機能障害を受けることにより、炎症性サイトカイン及び成長因子が活性化され、血管中膜層から中膜平滑筋細胞が分化、増殖、及び遊走して、内膜層で増殖を重ねることによって内膜肥厚が形成され则认为されている(Bryan A.J. and Angelini G.D., Curr.Opin. Cardiol. 9: 641-9 (1994); Angelini G.D. et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 99: 433-9 (1990); Angelini G.D. et al., Ann. Thorac. Surg. 53: 871-4 (1992); Waters

D.J. et al., Ann. Thorac. Surg. 56: 385-6 (1993); O' Neil G.S. et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 107: 699-706 (1994); Schwartz L.B. et al., J. Vasc. Surg. 15: 176-186 (1992); Galt S.W. et al., J. Vasc. Surg. 17: 563-70 (1993); Soyombo A.A. et al., Cardiovasc. Res. 27: 1961-7 (1993))。

遺伝子の発現は、遺伝子の転写調節領域に結合する転写調節因子により制御されている。転写調節因子の一つとして知られる蛋白質 NF $\kappa$ B は、p65 と p50 のサブユニットからなるヘテロ二量体である(Sen R. et al., Cell 46: 705-16 (1986))。NF $\kappa$ B は細胞が外から刺激を受けた場合の一次応答のスイッチとして機能すると考えられている。NF $\kappa$ B は細胞質中に発現された後、リン酸化により活性化され、核内へ移行しゲノム DNA 上の $\kappa$ B モチーフと呼ばれる約 10 塩基からなる特異的塩基配列に結合して種々の遺伝子の転写を活性化する。NF $\kappa$ B の刺激で転写される遺伝子として、(1)インターロイキン 1、2、3、6、8、12、腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )、リンホトキシン- $\alpha$ 、インターフェロン- $\alpha$ 等のサイトカイン、(2)顆粒球コロニー刺激因子、単球マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球・単球マクロファージコロニー刺激因子、インターロイキン 2 等の受容体、(3)補体因子 B、C3、C4、 $\alpha$ 1 酸糖蛋白質等のストレス蛋白質、(4)ICAM-1、VCAM-1、E-セレクチン等の白血球接着分子、(5)主要組織適合複合体クラス I 及び II、T 細胞受容体 $\alpha$ 及び $\beta$ 、 $\beta$ 2 ミクログロブリン等の免疫調節分子等が知られている(Immunology Today 19: 80 (1998))。

従来 NF $\kappa$ B の転写活性を阻害する物質としては、NF $\kappa$ B 結合性蛋白質(EP 第 584238 号公報)が知られており、また、非ステロイド系薬物であるアスピリン及びサリチル酸ナトリウムは高濃度で NF $\kappa$ B の活性を阻害する(Kopp E. et al., Science 265: 956 (1994))。さらに、ステロイド系薬物デキサメサゾン、細胞質内で NF $\kappa$ B と結合し、NF $\kappa$ B を不活性複合体の形態に維持する制御サブユニット I $\kappa$ B の産生を誘導することにより NF $\kappa$ B の活性化を阻害すると報告されている(Scheinman R.I. et al., Science 270: 283 (1995); Auphan N. et al., Science

e 270: 286 (1995))。

一方、特異的な転写因子による遺伝子の転写の活性化を特異的に妨げる方法の一つとして、シスエレメントデコイ(cis-element decoy)を用いた方法が W095/1687 号明細書に開示されている。シスエレメントデコイ、特異的転写因子に対して結合性を有する二本鎖 DNA 分子である。細胞に対して多量のシスエレメントデコイを供給することにより、転写因子はゲノム上の標的配列ではなく該シスエレメントデコイに対して結合することとなり、該転写因子による遺伝子の転写活性化が妨害される。また、本発明者らにより NF $\kappa$ B に対するデコイを用いることにより、転写調節因子 NF $\kappa$ B に起因する様々な疾患、例えば、虚血性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、ガンの転移浸潤、悪液質等の疾患を治療及び予防できることが示されている(W096/35430 号明細書)。

〔特許文献 1〕

特表平 8-502653 号公報

### 発明の開示

血管内膜肥厚を放置すると、狭心症、心筋梗塞、虚血性心疾患、大動脈瘤、下肢閉塞性動脈硬化症等が誘発される可能性があり、臨床上大きな問題となる。内膜肥厚や再狭窄を防ぐために全身薬物療法、例えば、抗血小板剤、血液凝固阻止薬、コルチコステロイド、及びカルシウムチャンネル遮断剤等についての検討が従来より成されている。また、内膜細胞の欠如、及び、血小板の活性化は新脈管内膜形成と密接に関っている(Luscher T.F. et al., Curr. Opin. Cardiol. 8: 963-74 (1993))。新脈管内膜肥厚は eNOS 遺伝子(Von der Leyen H.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1137-41 (1995))、または抗 PDGF(ferns G.A.A. et al., Science 253: 1129-32 (1991))、若しくは抗 bFGF 抗体(Olson N.E. et al., Am. J. Pathol. 140: 1017-23 (1992))の導入により抑制されることが知られている。また、その他の新生内膜肥厚を抑制する手法として、ラットの傷害

血管に対し E2F デコイを HVJ-リボソーム法により導入した例(Morishita R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 5855-9 (1995)), ウサギの頸静脈に sd i-1(p21)遺伝子を HVJ-リボソーム法により導入し、頸動脈に自家移植した例(Ba i HZ. et al., Ann Thorac Surg 66(3):814-9 Sep;discussion819-20(1998 )), ラットの傷害血管に対し NF $\kappa$ B デコイを HVJ-リボソーム法により導入した例(Yo shimura S et al., Gene Ther 8(21) Nov:1635-42(2001)), 及びヒトの静脈グラフトに E2F デコイを圧力介在(pressure-mediated)法により導入した例(Mann M.J . et al., Lancet 354: 1493-8 (1999))が知られている。

NF $\kappa$ B は、好中球及びマクロファージ化学走性因子、接着分子、並びに細胞周期を調節する遺伝子の発現にも関与しているようである。静脈移植病の機構においては、術後一週間目に好中球及びマクロファージの移動に続いて迅速に平滑筋細胞の増殖が中膜で起こり、静脈移植から 1 ～ 4 週目の間に中膜及び新脈管内膜の両方で細胞外マトリックスが合成される。従って、最低術後 4 週間の間に中膜における NF $\kappa$ B の活性化を抑制することにより、CABG で用いられる伏在静脈移植片における過剰な新脈管内膜肥厚形成及び続いての促進されたアテローム性動脈硬化を予防できるかも知れないと考えた。そこで、CABG 後の VGD の減弱を目的として、発明者らは実際の CABG を模倣する実験用 CABG モデルをイヌを用いて作成し、圧力介在トランスフェクション法(pressure-mediated transfection method)を改変し、NF $\kappa$ B デコイの VGD に対する効果をイヌ CABG モデルの静脈移植壁中に NF $\kappa$ B を改変圧力介在術中トランスフェクションする方法により調べた。

その結果、従来 *in vivo* において、または代替的な非冠動脈バイパスモデルで研究されていた NF $\kappa$ B デコイの VGD 予防効果が大動物モデルにおいて証明された。この結果により、NF $\kappa$ B デコイのトランスフェクションにより中膜平滑筋細胞の分化及び増殖が抑制されるだけでなく、新脈管内膜中の細胞外マトリックスの過剰な産生も抑制されることが組織病理学的方法により証明された。そして、NF $\kappa$ B デコイを導入した群における新脈管内膜形成は、スクランブルデコイを導入

した群のそれと比べて有意に抑制されていた。従って、NF $\kappa$ Bの活性化により静脈移植片中の中膜平滑筋細胞の分化及び増殖が引き起こされること、並びに、NF $\kappa$ Bデコイのトランスフェクションにより新脈管内膜形成が効果的に減弱されることが示唆された。

本発明者らにより、NF $\kappa$ Bデコイの静脈移植片壁へのトランスフェクションの新脈管内膜形成、中膜平滑筋細胞の分化及び増殖における4週間にわたる予防効果が証明され、CABG後の静脈移植片における新脈管内膜肥厚を減弱するためにNF $\kappa$ Bデコイを臨床的に適用できる可能性が示唆された。従って、本発明により以下の方法及び保護剤が提供された。

- (1) 血管または血管移植片の一部における転写因子NF $\kappa$ Bにより活性化される転写を調節する方法であって、該移植片を転写因子NF $\kappa$ Bに対するデコイと接触させる工程を含む方法。
- (2) 該血管または血管移植片の一部が静脈移植片である、(1)記載の方法。
- (3) 該血管または血管移植片の一部を *in vivo* または *ex vivo* でNF $\kappa$ Bに対するデコイと接触させることを含む、(1)または(2)記載の方法。
- (4) 圧力介在(pressure-mediated)法によりNF $\kappa$ Bに対するデコイを血管または血管移植片に導入する、(1)～(3)いずれかに記載の方法。
- (5) 転写因子NF $\kappa$ Bに対するデコイとの接触によって、移植片における新生内膜肥厚を抑制する、(1)～(4)いずれかに記載の方法。
- (6) NF $\kappa$ Bのデコイを含有する血管移植片の内膜肥厚に対する保護剤。
- (7) 該血管移植片が静脈移植片である、(6)記載の保護剤。
- (8) 圧力介在法により血管または血管移植片にNF $\kappa$ Bに対するデコイを導入するための、(6)または(7)記載の保護剤。

本発明で使用するNF $\kappa$ Bのデコイとしては、染色体上に存在するNF $\kappa$ Bの核酸結合部位と特異的に拮抗する作用を有する化合物で特に限定されない。例えば、核酸及びその類似体がそのような化合物として挙げられる。オリゴヌクレオチド

は DNA でも RNA でもよく、また天然に存在する核酸のみならず、核酸修飾体や擬核酸を含んでいてもよい。さらに、このようなオリゴヌクレオチドは 1 本鎖でも 2 本鎖でも良く、線状でも環状であっても良い。このような NF $\kappa$ B のデコイは、NF $\kappa$ B により認識される結合部位(内因性配列)に配列または構造のいずれかが似ているものである。即ち、このようなデコイのヌクレオチド配列は、NF $\kappa$ B により認識され結合するのに十分に相同的な配列を含むものである。

NF $\kappa$ B により認識される内因性の配列としては GGGATTTC(配列番号:1)が挙げられる。本発明のデコイ配列としては、ストリンジェントな条件下で該内因性配列と結合する配列を挙げることができる。このようなデコイ配列は、好ましくは内因性配列と 50%以上同一であり、より好ましくは 70%以上同一であり、さらに好ましくは 90%以上同一である。さらに、このような化合物には上記配列の変異体が含まれる。ここで、変異体とは、上記配列の一部が欠失、置換、付加または/及び挿入により変異しているものであり、NF $\kappa$ B が結合する核酸結合部位と特異的に拮抗する核酸を意味する。一方、蛋白質により認識される核酸配列の構造特性は、核酸デコイの折り畳み、ループ構造、よじれ、十字型、ヘリックス構造等により模倣することができ、必要に応じ架橋剤等の非核酸成分により構造を安定化することも可能である。

より具体的には、本発明の NF $\kappa$ B のデコイとしては内因性結合配列 GGGATTTC(配列番号:1)またはその相補配列を含むオリゴヌクレオチド(例えば、実施例で用いた 5' -CCTTGAAGGGATTTCCTCC-3' (配列番号:2))等を挙げることができる。特定のヌクレオチド配列を認識する核酸結合蛋白質の結合親和性は、結合部位に近接する核酸領域の配列により増強されることが知られている。従って、必要に応じ NF $\kappa$ B の結合を促進するような配列を、上述の内因性配列、または内因性配列の類似体に対して配置することも可能である。NF $\kappa$ B のデコイとしては、上記配列を 1 つまたは数個含む 2 本鎖オリゴヌクレオチドが挙げられる。本発明の NF $\kappa$ B のデコイとして機能するオリゴヌクレオチドには、生体内における分解を



抑制するためにリン酸ジエステル結合部の酸素原子をイオウ原子に置換したチオリン酸ジエステル結合を含むオリゴヌクレオチド(S-オリゴ)、及び、リン酸ジエステル結合を電荷のないメチルホスフェートで置換したオリゴヌクレオチド等が包含される。

本発明で用いられる NF $\kappa$ B デコイの製造は、通常のオリゴヌクレオチド化合物の製造で利用される化学的合成法または生化学的な合成法に従い行うことができる。例えば、核酸からなる NF $\kappa$ B の製造は、遺伝子工学的な手法により、例えば DNA 合成装置を用いて達成され得る。また、必要に応じ合成した DNA を鋳型として PCR 法により該核酸を増幅することもできるし、適当なクローニングベクターに該 DNA を挿入して増幅してもよい。さらに、得られた核酸を制限酵素等により切断したり、DNA リガーゼ等を用いて結合したりすることにより、所望の核酸を得ることもできる。細胞内で安定なオリゴヌクレオチドとするために核酸の塩基、糖、リン酸部分を化学修飾(アルキル化、アシル化等)することもできる。

本発明の NF $\kappa$ B デコイを含有する保護剤は、NF $\kappa$ B デコイを単独で含有することも可能であるが、必要に応じ、少なくとも 1 種類以上の添加剤及び/または助剤を含む形態とすることもできる。ここで、添加剤や助剤としては、例えば脂質、カチオン性脂質、ポリマー、核酸アプタマー、ペプチド及び蛋白質のような核酸の細胞中への移行を増大させたり、特定の細胞へ特異的に組成物が運搬されるようにしたり、細胞内における核酸の分解を抑制したり、細胞内における核酸の核への移行を促進したり、保存時に核酸を安定化したりすることができる化合物が挙げられる。

本発明の NF $\kappa$ B に対するデコイを含有する保護剤は、患部の細胞または組織に取り込まれるような形態であればその形態は特に制限されず、単独または適当な担体と混合して局所投与、非経口投与、外用または経口投与され得る。例えば、溶剤、懸濁剤、シロップ剤、リボソーム製剤(Szoka F. et al., Biochim. Biophys. Acta 601: 559 (1980)[逆相蒸発法]; Deamer D.W. et al., Ann. N.Y. Acad.

Sci. 308: 250 (1978)[エーテル注入法]; Brunner J. et al., Biochim. Biophys. Acta 455: 322 (1976)[界面活性剤法])、乳剤等の液体の形態、錠剤、顆粒剤、粉末剤、カプセル剤等の固形であってもよい。このような製剤形態においては、必要に応じ、種々の担体、助剤、安定化剤、潤滑剤等の添加剤を加えることができる。本発明の NF $\kappa$ B に対するデコイを含有する保護剤は、好ましくは圧力介在トランスフェクション法により患者に投与される。NF $\kappa$ B に対するデコイは、例えば、生理食塩水溶液中へ浸漬させ、圧力介在トランスフェクション法において 10~500mg、5~30 分の条件で患者の血管または血管移植片へ導入することができる。

本発明の NF $\kappa$ B に対するデコイと接触させる血管または血管移植片としては、内胸動脈、大伏在静脈を含む種々の血管が挙げられる。特に、静脈由来の移植片においては、本発明の NF $\kappa$ B デコイを含有する保護剤の効果が大きいことが予測され、静脈由来の移植片は本発明の対象血管移植片として特に好ましい。

本発明の NF $\kappa$ B デコイを主成分とする製剤は、血管または血管移植片における内膜肥厚を阻止するのに十分な量の NF $\kappa$ B デコイを含有する。NF $\kappa$ B デコイの投与量は、患者の年齢、病状、及び体重等の条件、使用するデコイの種類、並びに投与形態等により変化するが、当業者であればそれらの条件を勘案し、適当な量を選択することができる。圧力介在トランスフェクション法により本発明の NF $\kappa$ B を含有する保護剤を投与する場合、一般に、10~500 $\mu$ mol/l の濃度で生理食塩水溶液などへ浸漬させて、投与することができる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、圧力介在トランスフェクションの方法を模式的に示す図である。

図 2 は、下行大動脈と左前下行冠動脈の間に伏在静脈移植片を挿入したイヌ C ABG モデルを示す写真である。

図 3 は、組織病理学的研究の結果を示す写真である。3-1-a 及び b は、FITC-0

DNs の圧力介在トランスフェクションの効率を FITC 標識 ODNs を用いて組織化学的に評価した結果を示す。3-2-a 及び b は、新脈管内膜肥厚をヘマトキシリンエオシン染色により評価した結果を示す。3-3-a 及び b は、中膜平滑筋細胞の増殖を  $\alpha$ -アクチン染色により評価した結果を示す。3-4-a 及び b は、新脈管内膜中の細胞外マトリックス余剰産生を Masson 三色染色により評価した結果を示す。

図 4 は、中膜領域に対する新脈管内膜領域の割合を示す図である。

図 5 は、増殖細胞核抗原(PCNA)指数 (%) を示す図である。

### 発明を実施するための最良の形態

#### 1) デコイの調製

実験には以下の配列の二本鎖オリゴデオキシヌクレオチドを用いた。

NF $\kappa$ B デコイ: 5' -CCTTGAAGGGATTTCCTCC-3' (配列番号:2)

3' -GGAACCTCCCTAAAGGGAGG-5'

スクランブルデコイ: 5' -TTGCCGTACCTGACTTAGCC-3' (配列番号:3)

3' -AACGGCATGGACTGAATCGG-5'

手術の日まで、これらのデコイは -20°C で保存し、トランスフェクションするまで 4°C に置いた。トランスフェクションのために、室温下で 0.9% 生理食塩水注射溶液で 40  $\mu$ mol/L の濃度に調製した。

#### 2) 圧力介在トランスフェクションの条件検討

圧力介在トランスフェクションについては Mann らにより詳細なデータが報告されている (Mann M.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 6411-6 (1999))。予備的に、種々のトランスフェクション圧力及び時間におけるトランスフェクション効率を調べた。この予備的な実験で示されたトランスフェクション効率は、200mmHg の圧力下、20 分という条件でも Mann らにより示された 300mmHg 圧力下、10 分という条件と比べて大差はなかった(データ示さず)。むしろ、肢動脈バイパス移植手術における圧力介在トランスフェクションを 300mmHg 圧力下、

10 分の条件で行った場合、静脈移植片の新脈管内膜形成は NF $\kappa$ B デコイをトランスフェクトした群でも非常に顕著であり、スクランブルデコイをトランスフェクトした群では 6 検体のうち 3 検体が完全に閉塞された。そのため、300mmHg 圧力下 10 分という条件は、少なくとも冠動脈バイパス移植の静脈移植片へのデコイのトランスフェクションには最適なものではないと考えられた。そこで、以下の実験においては 200mmHg 圧力下 20 分という条件でトランスフェクションを行った。

### 3) イヌ CABG モデル

体重 18~20kg の雑種のイヌ(NRB; Nihon Nosan, Kanagawa, Japan または HBD; Oriental Yeast Corporation, Osaka, Japan)を標準食で飼育したものを利用した。ケタミン( 5mg/kg 体重, 筋肉注射)で麻酔した後、気管内挿管を行った。1. 5%セボフルランの吸入で通常麻酔下に維持し、伏在静脈移植片をイヌの左後肢から回収した。伏在静脈をおよそ 10cm 露出するために肢の外側を前後軸方向に切断した。周囲の組織から静脈を”未接触技術(no touch technique)”(Gottlob R., Minerca Chir. 32: 693-700 (1977))により切り離し、4-0 シルク結紮糸を用いて全ての側枝を結紮した。その後、イヌから静脈を回収し、ヘパリン化 0.9% 塩溶液で膨張させずに洗浄した(Angelini G.D. et al., Cardiovasc. Res. 21: 902-7 (1987))。その後、前静脈を同じ溶液中、室温で約 60 分間置いた。左第 4 肋間を開胸し、スクランブルデコイ(SD 群; n=5)または NF $\kappa$ B デコイ(ND 群; n=5)溶液(40 $\mu$ mol/L)を静脈移植片壁へ Mann らの方法(圧力介在トランスフェクション; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 6411-6 (1999))に従い、室温、2000mmHg の圧力で 20 分間かけて静脈移植片壁へ導入した(図 1)。ヘパリン(100 ユニット/kg 体重)を静脈注射した後、伏在静脈移植片を下行大動脈(descending Ao.)と左前下行冠動脈(LAD)の間に、心肺バイパス及び心停止なし(心鼓動下)で挿入した。即ち、静脈移植片及び左前下行冠動脈の間の末端-側部吻合を心鼓動下、7-0 Prolene(Ehicon, Inc., USA)を”Octopus”(Medotronic Inc., USA)スタビライザ

ーを用いて行い、静脈移植片の他の末端を下行大動脈に 6-0Prolene を用いて末端-側部の形で縫い付けた。LAD の隣接部は 4-0Prolene で縫合した (図 2)。

手術 3 日後に、イヌに抗生物質 (CEZ, Fujisawa pharmaceuticals, Japan) を投与した。術後 4 週間後にイヌを屠殺し、移植片を丁寧に回収した。実験は、大阪大学医学部動物実験委員会により承認されたガイドラインに従って行った。全ての動物は、National Society for Medical Research により作成された "Principles of Laboratory Animal Care" 及び米国国立衛生研究所 (NIH) から発行された『動物実験に関する指針 "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH publication No. 86-23, 改訂 1985) に沿って取り扱った。移植片を解離し、0.9% 生理食塩溶液で簡単に洗浄した。その後、移植片の真中部分を 3 つの部分、およそ 5mm の厚さに分けた。各部分を液体窒素に入れた凍結型中で、OCT 化合物 (Miles Scientific, USA) 中に凍結した。

#### 4) オリゴデオキシヌクレオチド (ODNs) の圧力介在トランスフェクションによる分布

各移植片の新たに凍結した塊からの横断切片 (厚さおよそ 5  $\mu$ m) における、オリゴデオキシヌクレオチド (ODNs) の圧力介在トランスフェクションによる分布を蛍光イソチオシアネート (FITC) 標識 ODNs (FITC-ODNs) を用いて組織化学的に評価した (図 3-1-a, b)。FITC-ODNs の圧力介在トランスフェクションによる分布を評価した後、同じ横断切片をヘマトキシリン エオシン (HE) で染色した。その後、デコイのトランスフェクション効率を計算した。FITC 陽性の核の数と、ヘマトキシリン陽性の核の数を NIH image で  $\times 200$  の倍率で数えた。デコイのトランスフェクション効率 (全核数に対する FITC 陽性核数の割合として定義される) の平均は  $77 \pm 20\%$  であった。

#### 5) 新脈管内膜及び中膜領域の測定

各移植片の新たに凍結した塊からの横断切片 (厚さおよそ 5  $\mu$ m) を HE で染色し、新脈管内膜及び中膜領域、並びに中膜に対する新脈管内膜の割合をこれらの H

- 13 -

E 染色した横断切片を用い、コンピューターイメージ解析ソフト“NIH image”により測定した。ND 群の新脈管内膜肥厚は SD 群と比べて有意に抑制されていた(図 3-2-a,b)。術後 4 週間に測定した横断切片中の新脈管内膜及び中膜の平均領域を表 1 に示す。

表 1

	SD (n=5)	ND (n=5)
新脈管内膜領域(mm <sup>2</sup> )	2.63±1.00	0.88±0.66*
中膜領域(mm <sup>2</sup> )	1.86±0.82	1.41±0.55*

術後 4 週間に測定した横断切片の新脈管内膜及び中膜の平均領域を示す。ND 群の平均新脈管内膜領域は SD 群のそれと比べて有意に抑制されていた(\*p<0.05 対 SD 群)。

さらに、中膜領域に対する新脈管内膜領域の割合を図 4 に示す。ND 群の中膜領域に対する新脈管領域の割合(新脈管内膜領域(mm<sup>2</sup>)/中膜領域(mm<sup>2</sup>))は 0.62±0.43 であり、SD 群の 1.45±0.45 に比べて有意に勝っていた(\*p<0.05)。全ての数値は平均±SD として表現される。Student' s nonpaired T テストを 2 つの群の比較に用いた。統計的有意差は、P<0.05 とした。

## 6)免疫組織化学研究

### 6-1. 中膜平滑筋細胞の増殖

中膜平滑筋細胞の増殖を平滑筋特異的  $\alpha$ -アクチンに対するモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的に評価した。凍結切片(厚さおよそ 5  $\mu$ m)を新しく凍結した組織の塊から切出し、 $\alpha$ -アクチン平滑筋特異的  $\alpha$ -アクチンに対するモノクローナル抗体(Histofine, Nichirei, Japan)、免疫組織化学染色は免疫ペルオキシダーゼアビジン-ビオチン複合体系において、塩化ニッケル顔料を用いて Babin の方法(Arterioscler. Thromb. 14: 1846-53 (1994))を改変して行った。染色の結果は、コンピューターイメージ解析ソフト“NIH image”で測定した。 $\alpha$ -ア

クチン染色により NF $\kappa$ B デコイのトランスフェクションにより中膜平滑筋細胞増殖が抑制される傾向にあることが示された(図 3-3-a,b)。

#### 6-2. 中膜平滑筋細胞の分化及び増殖

増殖細胞核抗原(PCNA)に対するモノクローナル抗体(PC-10, DAKO)を平滑筋細胞、並びに、分化及び増殖細胞の特異的マーカーとして用いる以外は、上記 5-1 における  $\alpha$ -アクチン染色と同様の手順による PCNA 染色を行った。中膜中の PCNA 陽性の核、及びヘマトキシリン陽性の核の数を NIH image により  $\times 200$  の倍率で数えた。細胞増殖の頻度は PCNA 指数で表現した。PCNA 指数は、中膜中の全核数に対する PCNA 陽性の核数の割合として定義する。

中膜平滑筋細胞の分化及び増殖を、術後 4 週間の横断切片について PCNA に対するモノクローナル抗体を用いて評価した。ND 群の PCNA 指数は  $13 \pm 4\%$  であり、SD 群の  $56 \pm 24\%$  より低かった(\* $p < 0.05$  対 SD 群)(図 5)。全ての数値は平均  $\pm$  SD として表現される。Student' s nonpaired T テストを 2 つの群の比較に用いた。統計的有意差は、 $P < 0.05$  とした。

#### 6-3. 細胞外マトリックス染色

細胞外マトリックス染色としてマッソン三色染色を行った。Masson 三色染色では、ND 群において新脈管内膜中の細胞外マトリックスの過剰な産生の抑制が観察された(図 3-4-a,b)。

#### 産業上の利用の可能性

従来 *in vivo* において、または代替的な非冠動脈バイパスモデルで研究されていた NF $\kappa$ B デコイの VGD 予防効果が大動物モデルにおいて証明された。本発明により、NF $\kappa$ B デコイのトランスフェクションにより中膜平滑筋細胞の分化及び増殖が抑制されるだけでなく、新脈管内膜中の細胞外マトリックスの過剰な産生も抑制されることが組織病理学的方法により証明された。本発明により、NF $\kappa$ B デコイの静脈移植片壁へのトランスフェクションの新脈管内膜形成、中膜平滑筋細

- 15 -

胞の分化及び増殖における予防効果が証明され、CABG 後の静脈移植片における新脈管内膜肥厚を減弱するために NF $\kappa$ B デコイを臨床的に適用できることが示された。



- 16 -

請求の範囲

1. 血管または血管移植片の一部における転写因子 NF $\kappa$ B により活性化される転写を調節する方法であって、該移植片を転写因子 NF $\kappa$ B に対するデコイと接触させる工程を含む方法。
2. 該血管または血管移植片の一部が静脈移植片である、請求項 1 記載の方法。
3. 該血管または血管移植片の一部を *in vivo* または *ex vivo* で NF $\kappa$ B に対するデコイと接触させることを含む、請求項 1 または 2 記載の方法。
4. 圧力介在(pressure-mediated)法により NF $\kappa$ B に対するデコイを血管または血管移植片に導入する、請求項 1 ～ 3 いずれか一項記載の方法。
5. 転写因子 NF $\kappa$ B に対するデコイとの接触によって、移植片における新生内膜肥厚を抑制する、請求項 1 ～ 4 いずれか一項記載の方法。
6. NF $\kappa$ B のデコイを含有する血管移植片の内膜肥厚に対する保護剤。
7. 該血管移植片が静脈移植片である、請求項 6 記載の保護剤。
8. 圧力介在法により血管または血管移植片に NF $\kappa$ B に対するデコイを導入するための、請求項 6 または 7 記載の保護剤。

1 / 5

図 1

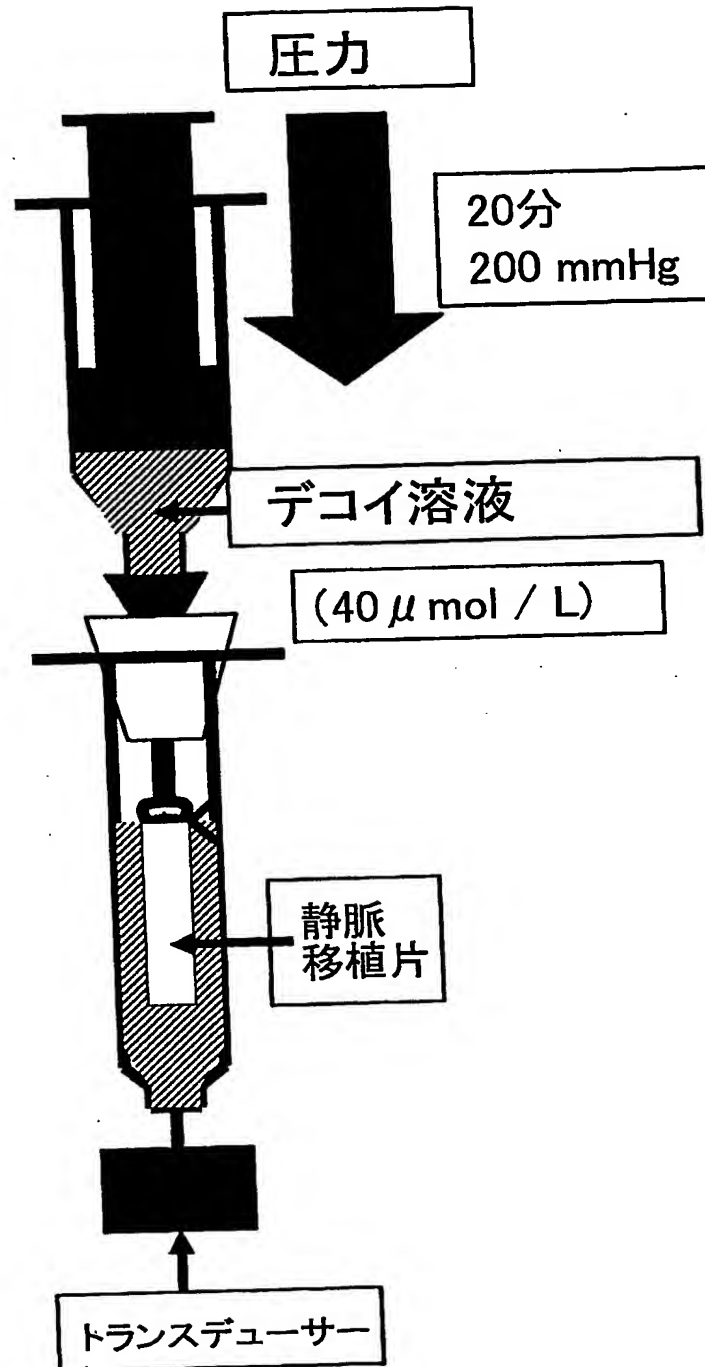


図 2

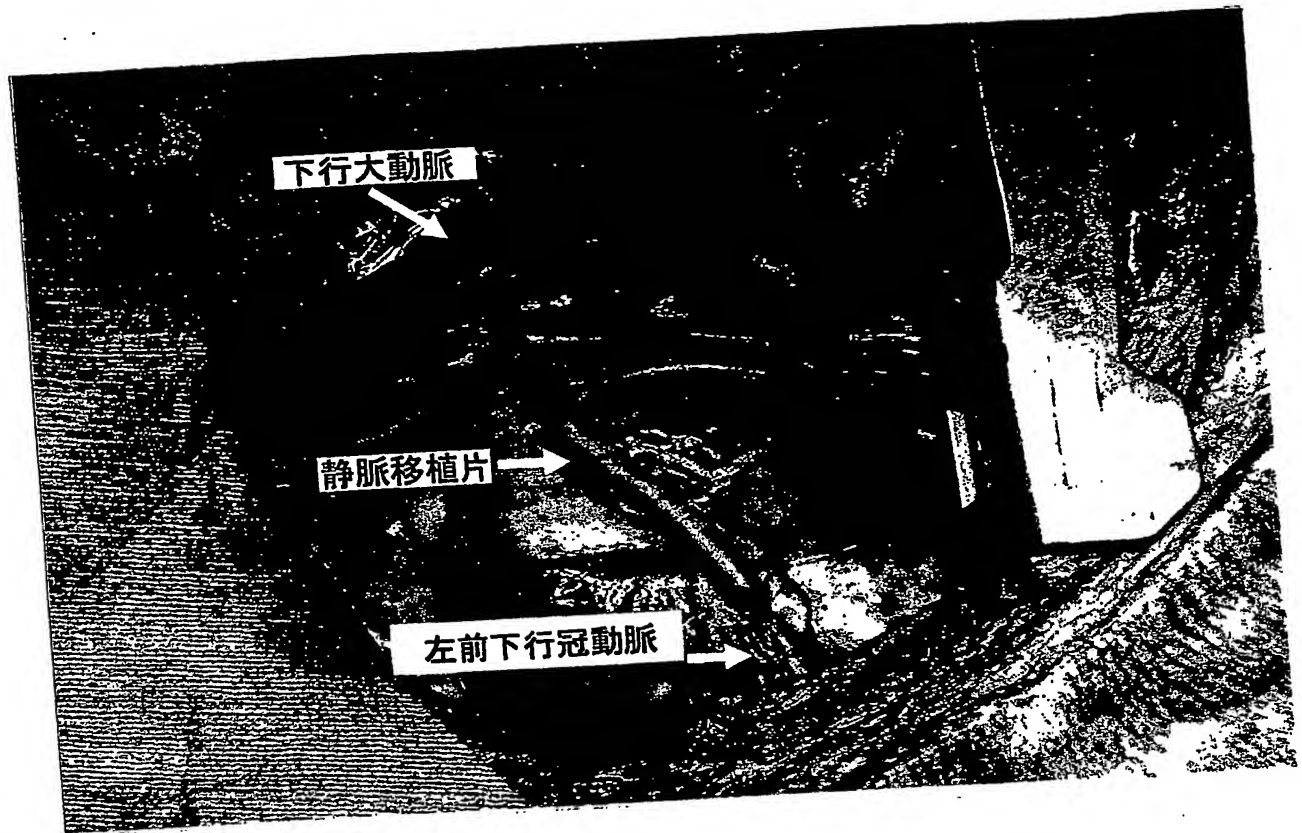
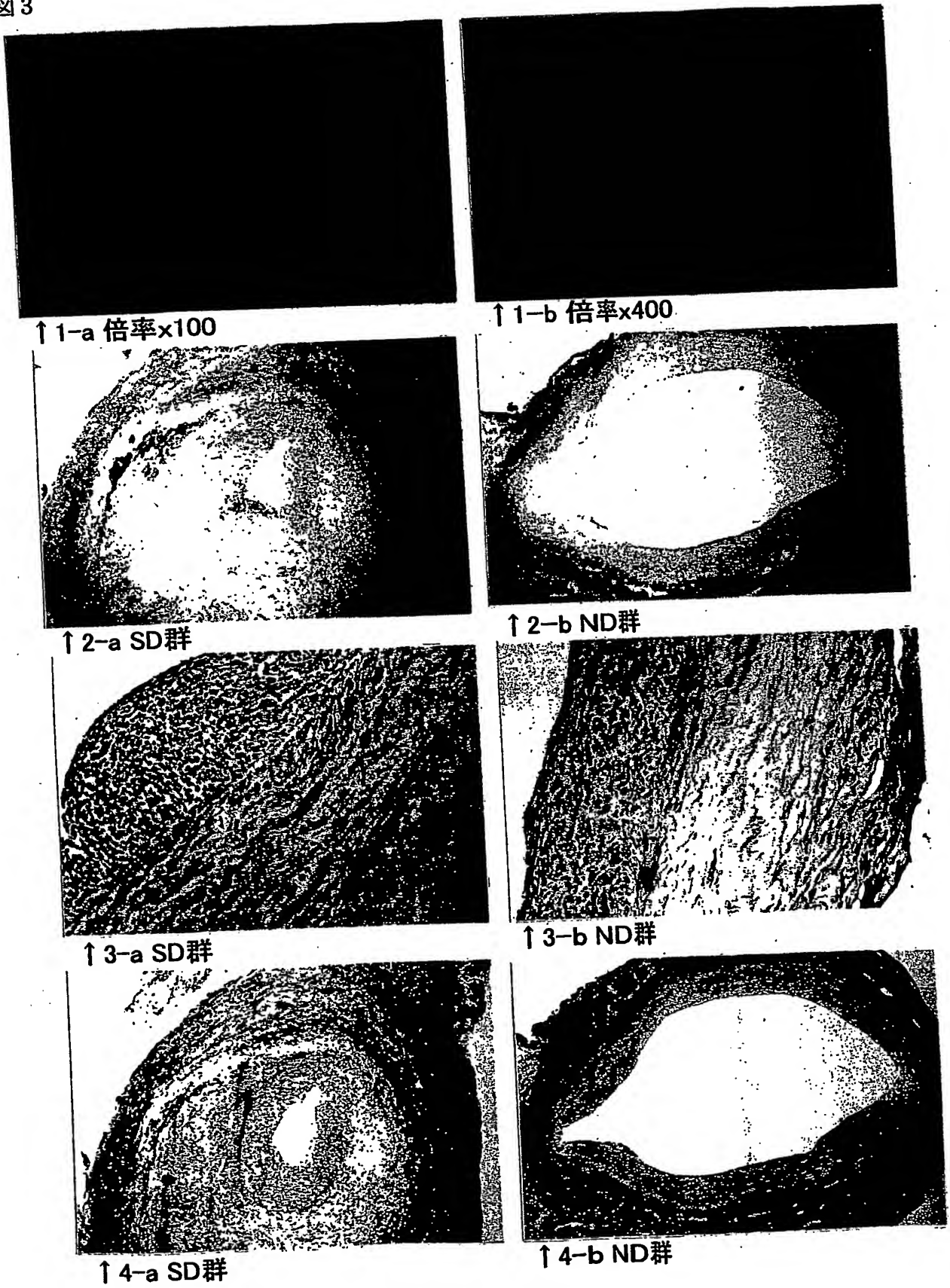
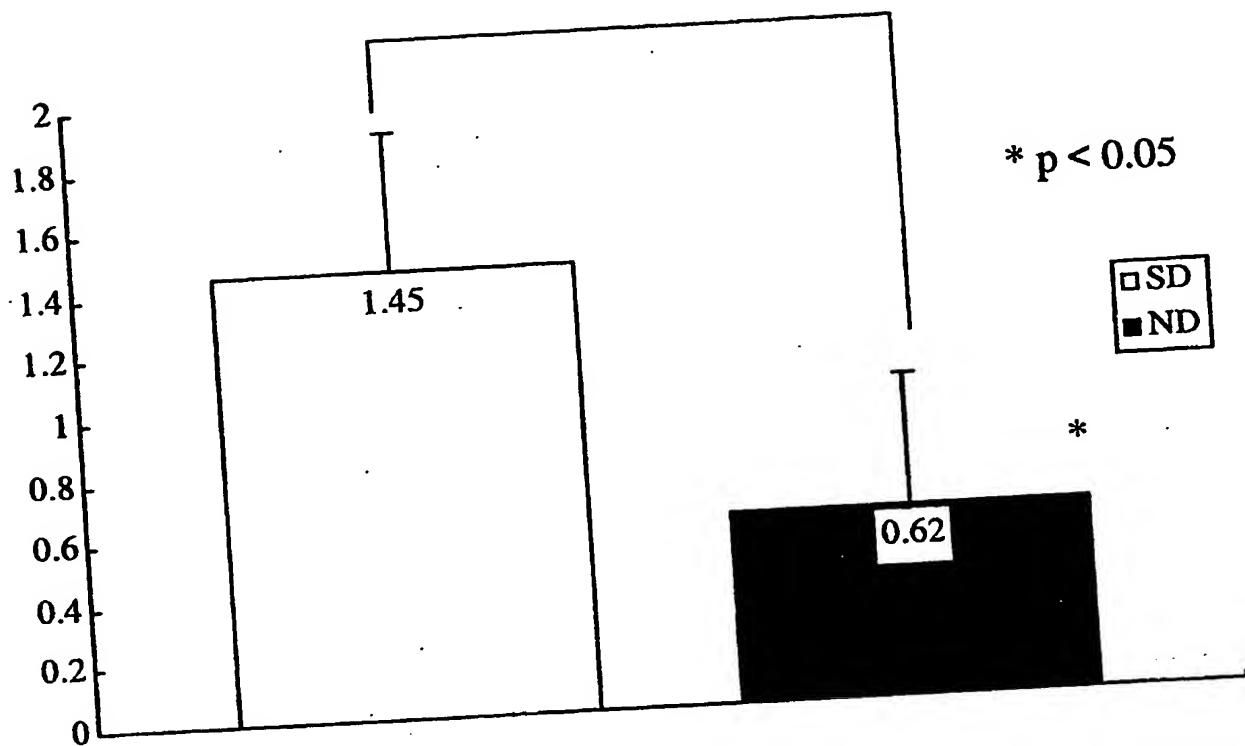


図 3



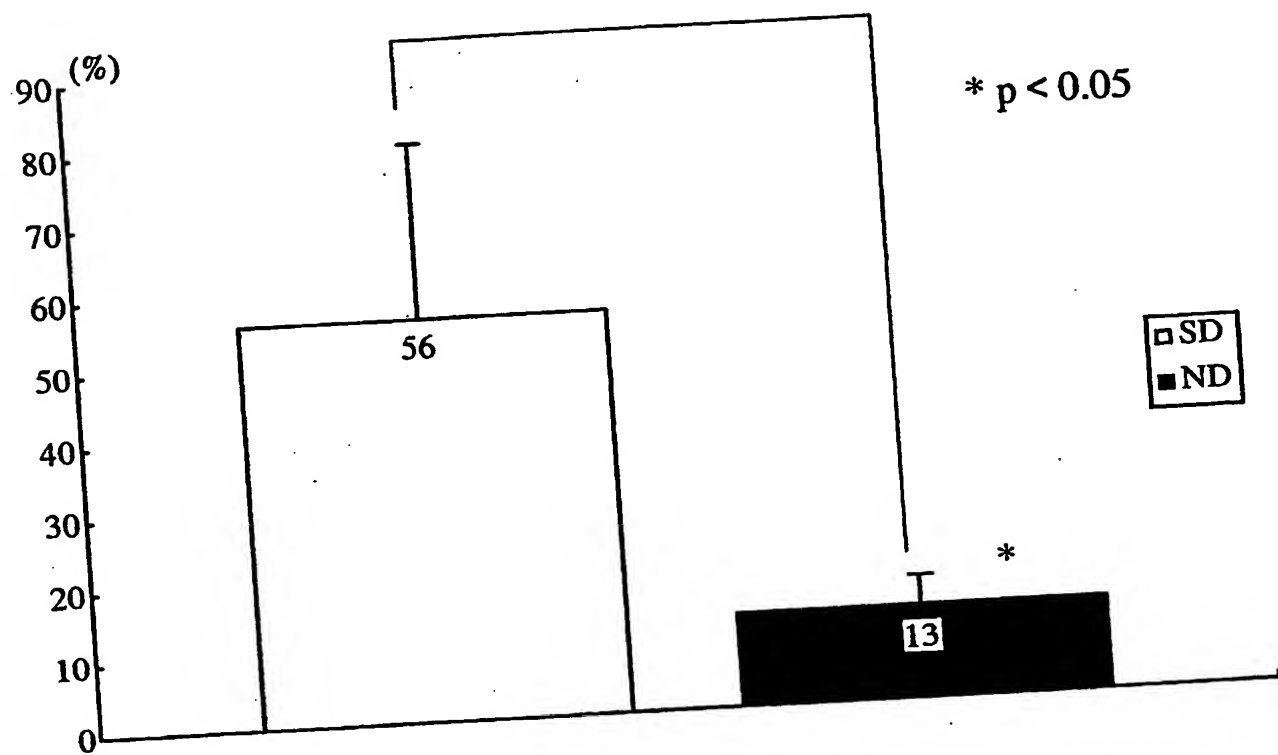
4 / 5

図 4

 $* p < 0.05$  vs. SD 群

5 / 5

図 5



\* p < 0.05 vs. SD群

1 / 3

SEQUENCE LISTING

<110> AnGes MG, Inc.

<120> Protecting agent for graft neointimal hyperplasia comprising  
NFkB decoy

<130> MED-X0204P

<140>

<141>

<150> JP 2002-275884

<151> 2002-09-20

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: cis element

2 / 3

decoy oligodeoxynucleotide

<400> 1

gggatttccc 10

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: cis element  
decoy oligonucleotide

<400> 2

ccttgaaggg atttcctcc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: scramble decoy



3 / 3

<400> 3

ttgccgtacc tgacttagcc 20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13805

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K48/00, 45/00, 31/711, A61P9/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K48/00, 45/00, 31/711, A61P9/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), REGISTRY (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	SHINTANI, Takuji et al., Intraoperative transfection of vein grafts with the NF-κB decoy in a canine aortocoronary bypass model: a strategy to attenuate intimal hyperplasia, <i>Annals of Thoracic Surgery</i> , 2002 October, Vol.74, No.4, pages 1132 to 1138, full text	6-8
Y	MANN Michael J. et al., Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial, <i>LANCET</i> , 1999, Vol.354, No.9189, pages 1493 to 1498, full text; particularly, page 1493, Summary	6-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
20 March, 2003 (20.03.03)

Date of mailing of the international search report  
15 April, 2003 (15.04.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13805

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YOSHIMURA, S. et al., Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model using cis-element 'decoy' of nuclear factor- $\kappa$ B binding site as a novel molecular strategy, Gene Therapy, 2001, Vol.8, No.21, pages 1635 to 1642, full text; particularly, page 1635, abstract	6-8
Y	HUYNH, Tam T. T. et al., Control of intimal hyperplasia by local modulation of NF- $\kappa$ B activity in experimental vein grafts, Surgical Forum, 1997, Vol.48, pages 441 to 444, full text; particularly, page 442, DISCUSSION	6-8
Y	EP 824918 A1 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 25 February, 1998 (25.02.98), Full text; particularly, Claim 1 & WO 96/35430 A1	6-8
Y	FEELEY, Brian T. et al., Nuclear factor- $\kappa$ B transcription factor decoy treatment inhibits graft coronary artery disease after cardiac transplantation in rodents, TRANSPLANTATION, 2000, Vol.70, No.11, pages 1560 to 1568, full text; particularly, page 1560, abstract; page 1561, left column, lines 19 to 25	8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13805

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-5

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 1 to 5 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K48/00, 45/00, 31/711, A61P9/00, 43/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K48/00, 45/00, 31/711, A61P9/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国登録実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案登録公報	1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)	BIOSIS (STN)
REGISTRY (STN)	EMBASE (STN)
MEDLINE (STN)	

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	SHINTANI, Takuji <i>et al</i> , Intraoperative transfection of vein grafts with the NF $\kappa$ B decoy in a canine aortocoronary bypass model: a strategy to attenuate intimal hyperplasia, <i>Annals of Thoracic Surgery</i> , 2002 Oct., Vol.74, No.4, pp1132-1138, 全文	6-8
Y	MANN Michael J. <i>et al</i> , Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial, <i>LANCET</i> , 1999, Vol.354, No.9189, pp1493-1498, 全文, 特に第1493頁Summary	6-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.03.03

国際調査報告の発送日

15.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

浜田 麻子



4 C

2938

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	YOSHIMURA, S. <i>et al</i> , Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model using cis-element 'decoy' of nuclear factor- $\kappa$ B binding site as a novel molecular strategy, Gene Therapy, 2001, Vol.8, No.21, pp1635-1642, 全文, 特に第1635頁Abstract	6-8
Y	HUYNH, Tam T. T. <i>et al</i> , Control of intimal hyperplasia by local modulation of NF- $\kappa$ B activity in experimental vein grafts, Surgical Forum, 1997, Vol.48, pp441-444, 全文, 特に第442頁DISCUSSION	6-8
Y	EP 824918 A1 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 1998.02.25, 全文, 特に請求項1 & WO 96/35430 A1	6-8
Y	FEELEY, Brian T. <i>et al</i> , Nuclear factor- $\kappa$ B transcription factor decoy treatment inhibits graft coronary artery disease after cardiac transplantation in rodents, TRANSPLANTATION, 2000, Vol.70, No.11, pp1560-1568, 全文, 特に第1560頁Abstract, 第1561頁左欄第19-25行	8

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1-5 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲1-5は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**